体外診断用医薬品　　　　　　　　**2009 年 11 月改訂
製品番号 6603849　　　　　　　　*2007 年　2 月改訂
承認番号 20200EZY00028000

日本標準商品分類番号
877449

*T 細胞サブセットキット サイトスタット／コールタークローン T11-RD1

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合には、保証しません。
4. ご使用にあたっては、測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用してください。

形状・構造等（ｷｯﾄの構成）

本品は、RD1（Phycoerythrin ＝ PE）で標識したモノクローナル抗体試薬（溶液）です。1 テストあたり以下の抗体タンパクを含有しています。

T11-RD1　：0.1～0.6μg/テスト

対象抗原：

T11：**CD2**（分子量 50kD）
CD2 抗原は、E-ロセットレセプタの関連抗原で、T 細胞分化の初期から発現する系統特異的 pan-T 細胞表面抗原です。この分子は、生体内では接着分子（LFA-2）として機能しています。正常では、骨髄中の前胸腺細胞の一部と胸腺細胞の 95%、すべての末梢 T 細胞と NK 細胞の一部に存在します。一度発現した後、CD2 は T 細胞の分化段階を通して発現が継続します。CD2 抗原は、末梢血の B 細胞、単球、顆粒球、血小板には検出されません。

クローン：

SFCI3Pt2H9（T11）
T 細胞性慢性リンパ性白血病患者から得られた腫瘍細胞で免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞とマウス NS/1-AG4 ミエローマ細胞の融合細胞から分離

Ig 構造：

マウス IgG1 H 鎖及びκ L 鎖

細胞毒性：

なし

原料及び精製法：

マウス腹水よりアフィニティクロマトグラフィで精製

標識：

T11-RD1：　RD1 (Phycoerythrin = PE)
RD1／抗体タンパク比＝0.5～1.5
励起波長 486～580nm、蛍光波長 568～590nm

試薬濃度：

1 バイアル 0.5mL 中の抗体以外の各種成分の濃度

BSA	：0.2%
リン酸カリウム	：0.01M
NaCl	：0.15M
NaN_3	：0.1%
スタビライザ	

使用目的

リンパ球細胞表面抗原の分析及び E-ロゼット形成 T 細胞の測定

測定原理

測定方法は、フローサイトメトリーを用いた直接免疫蛍光法です。すなわち、本品を T 細胞上の CD2 抗原に反応させ、細胞に波長 488nm の励起光を照射してオレンジ色蛍光を発光させ、それぞれの蛍光を光電子増倍管で増幅し、その電気信号をコンピュータで解析、表示させることにより各抗体陽性細胞の計測を行います。

前方散乱光（FS）と側方（90°方向）散乱光（SS）によるスキャッターサイトグラム上でリンパ球領域にゲートをかけることにより、自動的にリンパ球のみを計測し、蛍光強度の解析ができます。また、解析細胞数も数千個と多いため、高精度で再現性の良い結果が得られます。

操作上の注意

1. 本品はフローサイトメトリー専用試薬ですので、蛍光顕微鏡には用いないでください。
2. 本品は全血検体用に調製されています。新鮮または凍結保存した分離単核球検体への使用は好ましくありません。
3. 抗凝固剤としては、EDTA、ヘパリン等を用いることができますが、いずれの場合でも採血後は室温で保存し、6 時間以内に染色することをお勧めします。特に白血病細胞等では、保存によって急激に陽性率の低下を来す場合があるので注意してください。
4. 末梢血検体の場合、細胞のバイアビリティ（生残率）は 90%以上が好ましいですが、異常検体ではこれを下回ることがあります。白血病細胞などでは、保存により急激に生残率の低下を来す場合があるため、注意が必要です。
5. 溶血不良となるおそれがあるため、検体を試験管に分注する際は試験管の口や壁面に検体を付けないよう注意します。付着した血液は、綿棒等で取り除きます。
6. 病態と特定の白血球ポピュレーションの変動とは必ずしも一致しないため、測定結果は臨床及び他の診断上データと共に使用します。
7. 有核赤血球、タンパク濃度が異常な場合、ヘモグロビン合成異常では、赤血球の溶血が不完全となる場合があります。この場合、溶血していない赤血球をリンパ球としてカウントするために陽性率が実際よりも低くなるおそれがあるので注意します。
8. 溶血時間が長すぎると白血球も影響を受けることがあります。
9. 抗体試験の非特異的反応が予想される検体の対照には、サイトスタット/コールタークローン MsIgG1-RD1 などの陰性コントロール抗体試薬を使用します。
10. フローサイトメーターのレーザー光軸の調整不良や感度及びゲートの不適切な設定により、誤った結果が得られる場合があります。
11. CD2 抗原は、すべての末梢 T 細胞の他、NK 細胞の一部にも存在するため、CD2 陽性率は、成熟 T 細胞に特異的なマーカーである CD3 の陽性率より高いことが多いです。
12. 測定結果の解釈にあたっては、測定条件及び供血者の年令、性別、喫煙習慣等の影響も考慮します。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

モノクローナル抗体試薬はそのまま使用します（1 テストあたり 10μL）

【その他必要な試薬】

1. 溶血試薬
   次のいずれかを用います。
   1）イムノプレップ試薬システム
   製品番号 7546999　容量 300 テスト（TQ-Prep、Multi-Q-Prep 用）
   製品番号 7546946　容量 100 テスト（Q-Prep 用）
   2）コールター全血ライジングキット
   製品番号 6603152　容量 300 テスト
   イムノライズ（溶血試薬）1mL に PBS（下記）24mL を加えます。
   フィクサティブ（固定試薬）はそのまま使用します。
   （医薬用外劇物：9.25%のホルムアルデヒドを含有するため、取り扱いには十分注意してください。）
   3）その他のフローサイトメトリー用溶血試薬
   溶血試薬の添付文書に従って調製、使用します。
   健常者末梢血等の陽性コントロール検体を用いて、本品に使用可能であることを事前に確認してください。
2. PBS（リン酸緩衝生理食塩水、イムノプレップ試薬システムを用いる場

合は原則として不要）

PBS バッファ（製品番号 6603369）1 パックを蒸留水 500mL に溶解します。調整後の pH は 7.2±0.2 で、防腐剤等は含んでいません。

3. コントロール試薬（アイソタイプコントロール抗体）

サイトスタット／コールタークローン MsIgG1-RD1（T11-RD1 用）
製品番号 6604112 容量 50 テスト（0.5mL）

【検体の採取と白血球数の調整】

検体には抗凝固剤（EDTA 推奨）を用いて採血した末梢血を用います。試験管 1 本につき 100μL の血液を用いるため、測定項目数＋対照の試験管分と検体希釈のための自己血漿採取用として、通常 1 検体につき 1～2mL の血液が必要となります。

染色に最適な白血球数の範囲は 3～10×10^3 個/mm^3 であるため、白血球数が 10×10^3 個/mm^3 を超える場合は検体を希釈します。逆に 3×10^3 個/mm^3 より少ない場合は遠心してバフィーコートを回収します。Q-PREP/イムノプレップ試薬システムを用いて赤血球を溶血する場合は、同一患者の血漿で検体を希釈します。それ以外の溶血試薬を用いる場合にはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈します。

注）検体は採血後室温（20～25℃）で保存してください。採血後 6 時間以内に操作を開始することをお勧めします。

【参考: 白血球数の調整法】

A）白血球数が多い検体の場合（＞10×10^3 個/mm^3）

白血球数			希釈倍数
10～20	×10^3	:	2 倍
20～30	×10^3	:	3 倍
30～40	×10^3	:	5 倍
40～60	×10^3	:	6 倍
60～100	×10^3	:	10 倍
100～200	×10^3	:	20 倍

B）白血球数が少ない検体の場合（＜3×10^3 個/mm^3）

バフィーコート法

（1）検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心します。
（2）白血球の層をパスツールピペットで採取します。この際、すべての白血球を確実に回収するため赤血球及び血漿も一部回収します。
（3）数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
（4）コールターLH700 シリーズ等のヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
（5）細胞濃度を 3～10×10^3 個/mm^3 に調整する。1テストあたり 100μL を用い、以下の操作手順に従って処理します。

【操作方法】

溶血試薬には、以下のいずれかを使用します。

1. イムノプレップ試薬システム（TQ-Prep™または Q-Prep™ 自動サンプル処理装置専用の溶血・固定試薬）
   ① イムノプレップ A（溶血試薬）
   ② イムノプレップ B（反応停止試薬）
   ③ イムノプレップ C（固定試薬）

2. コールター全血ライジングキットなどフローサイトメトリー用の溶血試薬

注）溶血試薬の添付文書に従って操作してください。

A）イムノプレップを用いる場合（Q-Prep 法）

1）テスト用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
2）それぞれの試験管に全血 100μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ります。
3）モノクローナル抗体試薬 10μL をテスト用の試験管に加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬（サイトスタット/コールタークローン MSIgG1-RD1、別売）を 10μL 加えます。
4）よく撹拌した後、室温で 10 分間反応させます。
5）試験管を TQ-Prep（または Q-Prep）で溶血・固定処理します。

注）ベックマン・コールター社製フローサイトメーター以外の装置（前方散乱光を狭角で検出する装置）で測定する場合には、溶血後のサンプルにイオン交換水または蒸留水を 0.5mL 加えます。

6）フローサイトメーターでリンパ球領域の蛍光陽性率を測定します。
7）調製したサンプルは、室温で 2 時間まで保存できます。2 時間を超えるときは、2～8℃で遮光保存し、調製後 24 時間以内に測定してください。

B）コールター全血ライジングキットを用いる場合（コールター全血法）

注）その他の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の添付文書に従って操作してください。

1）テスト用と対照用に試験管を用意します。
2）それぞれの試験管に全血 100μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ります。
3）モノクローナル抗体試薬 10μL をテスト用の試験管に加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬（サイトスタット/コールタークローン MSIgG1-RD1、別売）を 10μL 加えます。
4）よく撹拌し、室温で 45 分間反応させます。
5）PBS を 2～3mL 加えて撹拌し、400～450×g、5 分間遠心分離します。
6）上清を吸引除去します。
7）溶血試薬（キット中の「イムノライズ」を PBS で 25 倍希釈）を 1mL 加えてよく撹拌し、30 秒～2 分間室温で放置します。
8）溶血が完了（サンプルの透明度が増す）したら、直ちにキット添付の「フィクサティブ」を 250μL 加え、撹拌します。
9）PBS を 2mL 加え、再度撹拌します。
10）400～450×g、5 分間遠心分離します。
11）上清を吸引、除去します。
12）9）～11）の操作を繰り返します。
13）PBS を 500μL 加え、よく撹拌します。
14）フローサイトメーターでリンパ球領域の蛍光陽性率を測定します。検体はアイスバス中で遮光保存し、速やかに測定を行います。

測定結果の判定方法

1. 正しく調整されたフローサイトメーターを用います。
2. FS と SS のサイトグラム上で明瞭な白血球 3 分画（リンパ球、単球、顆粒球）が得られるように FS のスレッショルドと散乱光のゲインを確認、調整します。
3. リンパ球領域に解析ゲートを設定し、RD1（PE）蛍光（Log スケール）の 1 パラメータ蛍光ヒストグラムを取得します。対象用のサンプルで蛍光陽性領域を設定します。

図 1. ヒストグラム例（Q-Prep 法、遠心洗浄なし）

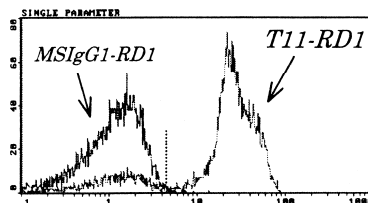
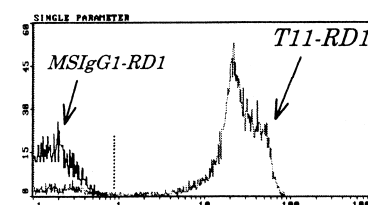



図 2. ヒストグラム例（コールター全血法）

絶対数の計算

CD2 陽性細胞の絶対数は、Flow-Count™（絶対数測定用試薬、製品番号 7547053）を併用して簡便かつ高精度に測定できます。また、各サブセットの陽性率と血球数算定の結果から次式により計算することもできます。

絶対数（個/mm^3）＝
総白血球数（個/mm^3）×リンパ球%×陽性率%／10^4

【測定条件の確認】

サイトトロール（製品番号 6604248）やイムノトロール（製品番号 6607077）などの精度管理用コントロール細胞や健常者の末梢血などを用いて、フローサイトメーターの設定やゲーティングなどの測定条件の正

確性を確認することをお勧めします。

Fc レセプタを介した単球、顆粒球に対する非特異結合はリンパ球領域を正しくゲーティングすることで除外できます。

検体ごとに抗体の非特異的な結合を確認するには、適切なアイソタイプコントロール試薬（サイトスタット／コールタークローン MSIgG1-RD1）を用います。健常者検体の場合、コントロール試薬の陽性率は通常 1～2%となります（2%を上回る場合、測定結果は誤差を含んでいるおそれがあります）が、腫瘍検体ではより高い値を示すことがあります。

臨床的意義

ヒト末梢血のリンパ球は T 細胞、B 細胞及び NK 細胞の 3 つの細胞集団で構成されています。これらの細胞型は、顕微鏡検査による形態によって区別できませんが、細胞膜上に発現する分化成熟段階や機能的サブセットに特有な抗原を利用することによって同定することが可能です。

“Pan-T 細胞”抗原及び“Pan-B 細胞”抗原に特異的なモノクローナル抗体は、それぞれ成熟 T 細胞及び B 細胞の同定・算定に用いることができます。また、リンパ球の成熟（分化）段階や機能的分類は、特定の細胞表面抗原に特異的なモノクローナル抗体を用いて確定することができます。本品は、“pan-T 細胞”抗原である CD2 に特異的に結合する T11 モノクローナル抗体によって、末梢血の T 細胞数を測定します。

蛍光抗体法によりリンパ球の分類を行う場合、通常は比重遠心分離あるいは溶血処理により赤血球を除去し、リンパ球分画を回収しています。いずれの方法とも混入した分離液や溶血試薬あるいは未反応の抗体を除去するため、撹拌～遠心分離～アスピレーションの操作を繰り返す必要があります。この一連の操作の繰り返しにより、腫瘍細胞や活性化細胞がダメージを受けるおそれがあります。また、アスピレーション操作による細胞の流失も生じます。この問題を解決するため、遠心分離～アスピレーション操作の必要ない検体処理法（No-Wash 法）が考案され、全血サンプルを No-Wash 法で処理する自動前処理システムとして Q-PREP 及び TQ-Prep が開発されています。サイトスタット／コールタークローンはバックグラウンドの蛍光が低く、Q-PREP または TQ-Prep による前処理に最適なリンパ球サブセット分析用モノクローナル抗体試薬です。
多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、皮膚炎などの自己免疫疾患の患者では、T 細胞の減少が見られます。また、胸腺無形成症（DiGeorge 症候群）は T 細胞の減少を来たします。一方で、T 細胞の増加は、急性期の伝染性単核症や活性化した抑制性リンパ球が関与した後天性の無γグロブリン血症などの患者で認められています。

性能

【期待値】

自社施設にて、19～65 歳の健常者男女の末梢血を本品で測定して得られた T11 陽性率の範囲は 60～92%でした。これはあくまでも期待値の一例であり、各施設で期待値を設定してください。

【特異性】

T11 モノクローナル抗体は、白血球分化抗原に関する国際ワークショップにおいて CD2 抗体として認定されています。
本品は、ロットごとのスクリーニングで、B 細胞系の培養細胞株（バーキットリンパ腫由来、CD20 陽性率 85～100%）に交差反応しないことが確かめられています。
本品は、胸腺細胞の 95%以上と末梢血の T 細胞、一部の NK 細胞に反応しますが、末梢血の B 細胞、単球、顆粒球、血小板とは反応しません。

【同時再現性】

自社施設で、末梢血 3 検体をそれぞれ 10 回繰り返し測定したときの T11 陽性率の変動係数（%CV）は次のとおりでした。

サイトスタット/コールタークローン T11-RD1 陽性率

検体	n	平均値	SD	%CV
1	10	21.3	0.62	2.9
2	10	78.2	0.39	0.5
3	10	88.5	0.40	0.4

使用上または取扱上の注意

1. 本品はアジ化ナトリウムを 0.1%含んでいます。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産生するので、取り扱いには十分注意してください。また、アジ化物が金属性の排水管内に蓄積することによる爆発の危険性を避けるため、アジ化物の廃棄は多量の流水で希釈して行ってください。
2. 有効期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
3. 検体及び検体に触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適切な表示及び処理をした後に廃棄してください。
4. ピペットを口で吸引しないでください。皮膚や粘膜への検体の接触を避けてください。
5. 保管及びインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないでください。
6. 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
7. 試薬の外観に変化が見みられる、もしくはコントロール検体による測定値に大きな変化がある場合は、試薬の劣化が考えられるので使用しないでください。本品の正常な外観は、淡いピンク色の透明な液体です。

貯法、有効期限、安定性

1. 本品は冷蔵（2～8℃）で保存してください。凍結させないでください。
2. 長時間光にさらすことは避けてください。
3. 有効期限は、バイアルに明記されています。

包装単位

サイトスタット／コールタークローン T11-RD1
製品番号 6603849 容量 50 テスト（0.5mL）

主要文献

1. Bernard A. Boumsell L Dausset J, Milstein C and Schlossman SF, eds: 1984. Leukocyte Typing. New York: Springer-Verlag. p.26, 28, 41-42, 196, 201, 215-216
2. McMichael A.J. ed: 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, p.38-40, 42, 106-107, 116, 199, 302-306, 308, 315, 475.
3. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID: 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag. Vol. 1, p.6, 16, 364-365.
4. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell: 821-827.
5. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF and Scholossman SF: 1983. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. J Immunol 131: 244-250.
6. Reinherz EL and Schlossman SF: 1981. The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. Immunol Today 2: 69-75.
7. Koepke JA and Landay AL: 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52: 19-27.

**問い合わせ先

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目５番７号 TOC 有明ウエストタワー

TEL: 0120-566-730 FAX: 03-5530-2460

**製造販売元

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目５番７号 TOC 有明ウエストタワー